






**Urokinase inhibitor, useful for treatment, prophylaxis or diagnosis of thromboembolic disease, comprising acylated 3- or 4-amidino-benzylamine derivative**

<b>Publication number:</b> DE10029014 (A1)	<b>Also published as:</b>
<b>Publication date:</b> 2001-12-20	 US2003166576 (A1)
<b>Inventor(s):</b> STUERZEBECHER JOERG [DE]; STEINMETZER TORSTEN [DE]; KUENZEL SEBASTIAN [DE]; SCHWEINITZ ANDREAS [DE] +	 US6831196 (B2)
	 JP2004503526 (T)
<b>Applicant(s):</b> UNIV SCHILLER JENA [DE] +	 EP1294742 (A2)
<b>Classification:</b>	 EP1294742 (B1)
<b>- International:</b> C12N9/99; A61K9/02; A61K9/08; A61K9/16; A61K9/20; A61K9/28; A61K9/48; A61K9/70; A61K31/18; A61K38/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K5/06; C12N9/99; A61K9/02; A61K9/08; A61K9/16; A61K9/20; A61K9/28; A61K9/48; A61K9/70; A61K31/18; A61K38/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K5/00; (IPC1-7): C07K5/06; A61K49/00; C12N9/99	more >>
<b>- European:</b> C07K5/06A1F; C07K5/06A1F1	
<b>Application number:</b> DE20001029014 20000615	
<b>Priority number(s):</b> DE20001029014 20000615	

**Abstract of DE 10029014 (A1)**

A novel urokinase inhibitor comprises an acylated 3- or 4-amidino-benzylamine derivative (I). A novel urokinase inhibitor comprises an acylated 3- or 4-amidino-benzylamine derivative of formula (I). X = CH or N; R1 = H, 1-8C alkyl or -(CH2)nOH; n = 1-5; R2 = H or 1-8C alkyl; R3 = 1-8C alkyl or -(CH2)n-OR6; R4 = SO2R', COR', COOR' or H; R5 = H, OH, COR or COOR; R, R6 = 1-16C alkyl or (all optionally substituted) aryl, heteroaryl, aralkyl or heteroaralkyl; R' = as R; or an adamantyl or camphor residue; the amidino group is in the 3- or 4-position.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 29 014 A 1**

⑤⑦ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 K 5/06**  
A 61 K 49/00  
C 12 N 9/99

⑳ Aktenzeichen: 100 29 014.0  
㉔ Anmeldetag: 15. 6. 2000  
㉕ Offenlegungstag: 20. 12. 2001

**DE 100 29 014 A 1**

⑦① Anmelder:  
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE

⑦② Erfinder:  
Stürzebecher, Jörg, Dr.rer.nat., 99094 Erfurt, DE;  
Steinmetzer, Torsten, Dr.rer.nat., 07743 Jena, DE;  
Künzel, Sebastian, Dipl.-Bio.-Chem., 07743 Jena,  
DE; Schweinitz, Andreas, Dipl.-Chem., 07745 Jena,  
DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤④ Urokinase-Hemmstoffe

⑤⑦ Es soll ein auch für therapeutische Anwendungen geeigneter Wirkstoff angegeben werden, der Urokinase mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Syntheseaufwand herstellbar ist. Überraschend wurde gefunden, dass Derivate des Amidinobenzylamins, insbesondere des 4-Amidino-benzylamins, mit zwei gebundenen Aminosäuren eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven uPA-Hemmstoffen darstellen. Die Urokinase-Hemmstoffe werden für medizinische Anwendungen, beispielsweise zur Behandlung von malignen Tumoren sowie der Metastasierung, eingesetzt.

**DE 100 29 014 A 1**

- [0001]** Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.
- 5 **[0002]** Die Ausbreitung und Metastasierung solider Tumoren in umgebendem Gewebe wird durch ihre Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix in der Umgebung der Tumorzelle abzubauen bzw. die Basalmembran zu durchdringen, ermöglicht. In diesem Prozess kommt neben verschiedenen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsinen vor allem dem Plasminogen-aktivator Urokinase (uPA) eine zentrale Bedeutung zu (P. Mignatti und D.B. Rifkin, *Physiol. Rev.* 73, 161–195, 1993). So bewirkt uPA die Aktivierung von Plasminogen; das entstehende Plasmin kann die Komponenten der extrazellulären
- 10 Matrix (Fibrin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane u. a.) abbauen sowie Metalloproteasen und pro-Urokinase zu uPA aktivieren (U. Reuning et al., *Int. J. Oncol.* 13, 893–906, 1998).
- [0003]** Sowohl pro-Urokinase als auch uPA binden an den uPA-Rezeptor (uPAR), einen an der Zelloberfläche lokalisierten, spezifischen Rezeptor. Dadurch wird eine Verstärkung und Lokussierung der Aktivität von uPA und damit der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht. Sowohl in zellbiologischen Studien als auch
- 15 in Tiermodellen konnte die Bedeutung dieses zellassozierten Plasminogenaktivator-Systems für Tumorstadium und -ausbreitung gezeigt werden. So wird das invasive Potential von Tumorzellen bei Hemmung der enzymatischen Aktivität von uPA durch die natürlichen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 herabgesetzt (J.-F. Cajot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6939–6943, 1990; M. Baker et al., *Cancer Res.* 50, 4876–4884, 1990). In Fötusembryos konnte durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA die durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen fast vollständig verhindert werden (L. Ossowski et al., *Cell* 35, 611–619, 1983).
- 20 **[0004]** Die Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) sind in den letzten Jahren in Hinsicht ihrer klinischen Relevanz für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht worden. Insbesondere der Gehalt von uPA im Gewebe verschiedener Tumoren erwies sich als ein Prognosefaktor. So haben Patienten mit hohem uPA-Spiegel eine schlechtere Prognose als solche mit niedriger uPA-Konzentration im Tumor
- 25 (M. Schmitt et al., *Thromb. Haemost.* 78, 285–296, 1997; R. W. Stephens et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 52, 99–111, 1998). Auch eine erhöhte Konzentration an uPAR im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose (H. Pedersen et al., *Cancer Res.* 54, 4671–4675, 1994; C. Duggan et al., *Int. J. Cancer* 61, 597–600, 1995).
- [0005]** Aus den Befunden zum prognostischen Wert des uPA- und uPAR-Gehaltes im Tumorgewebe kann angenommen werden, dass synthetische uPA-Inhibitoren in der Lage sind, Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Die Zahl der bisher bekannten uPA-Hemmstoffe ist allerdings relativ klein. Die Mehrzahl besitzt nur eine geringe Spezifität und Wirkungsstärke, wie es für verschiedene Benzamidin- und  $\beta$ -Naphthamidin-Derivate zutrifft (J. Stürzebecher und R. Markwardt, *Pharmazie* 33, 599–602, 1978). Das von Vassalli und Belin (*FEBS Letters* 214, 187–191, 1997) als uPA-Hemmstoff beschriebene Amilorid ist zwar ein spezifischer, aber schwacher Inhibitor von uPA ( $K_i = 7 \mu\text{M}$ ).
- 35 **[0006]** Stärker wirksame uPA-Inhibitoren wurden mit 4-substituierten Benzothiofophen-2-carboxamidinen ( $K_i = 0,16 \mu\text{M}$  für Verbindung 623) gefunden. Hemmstoffe dieses Typs inaktivieren auch uPA, die an uPAR gebunden ist (M. J. Towle et al., *Cancer Res.* 53, 2553–2559, 1993). Die Benzothiofophen-Derivate sind sehr spezifisch, ihre Hemmwirkung gegenüber Plasmin und dem Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA) ist gering, allerdings ist die Synthese von Verbindungen dieses Typs sehr aufwendig.
- 40 **[0007]** Eine vergleichbare Spezifität haben auch 4-Aminomethylphenylguanidin-Derivate, deren Hemmwirkung gegenüber uPA ( $K_i = 2,4 \mu\text{M}$  für die wirksamste Verbindung) allerdings vergleichsweise gering ist (S. Sperl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5113–5118, 2000).
- [0008]** Im Gegensatz dazu erreichen N $\alpha$ -Triisopropylphenylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-Derivate mikromolare  $K_i$ -Werte ( $0,41 \mu\text{M}$  für die wirksamste Verbindung), sind allerdings sehr unspezifische uPA-Hemmstoffe, mit gleicher oder stärkerer Wirkung werden Trypsin, Thrombin und Plasmin inhibiert (J. Stürzebecher et al., *Bioorg. Med. Letters* 9, 3147–3152, 1999). Sehr wirksame uPA-Hemmstoffe sind in der WO 99/05096 mit weiterentwickelten  $\beta$ -Naphthamidinen offenbart. Es werden  $\text{IC}_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich beschrieben, allerdings keine Angaben zur Selektivität und der biologischen Wirksamkeit gemacht.
- 45 **[0009]** Bisher wurden nur wenige Peptide als uPA-Hemmstoffe beschrieben, die sich von der Substrat-Sequenz ableiten. Kettner und Shaw (*Methods in Enzymology*, 80, 826–842, 1981) beschrieben Chlormethylketone, die zwar uPA irreversibel hemmen, aber nicht für in vivo-Anwendung geeignet sind.
- 50 **[0010]** In der EP 18 32 71 sind Lysin-Derivate offenbart, die eine gewisse uPA-Hemmung bewirken, allerdings auch andere vergleichbare Enzyme hemmen und damit nur sehr speziell bzw. eingeschränkt für medizinische Zwecke verwendbar sind. Gleiches gilt für die in der WO 95/17 8 85 als uPA-Inhibitoren beschriebenen niedermolekularen Polypeptide (ca. 50 Aminosäuren), die sich von natürlichen Hemmstoffen ableiten. Auf Grund ihres Peptidcharakters und der Molekülgröße ist ihr in vivo-Einsatz stark eingeschränkt. Bei der Suche nach Hemmstoffen des Thrombins, einem mit uPA verwandten Enzym, wurden dagegen mit Tripeptid-Derivaten vom D-Phe-Pro-Arg-Typ mit C-terminalem Arginin sowohl in Hinblick auf Hemmwirkung als auch Bioverfügbarkeit bemerkenswerte Fortschritte erzielt; es wurden picomolare  $K_i$ -Werte erreicht und die orale Bioverfügbarkeit verbessert (T.J. Tucker et al., *J. Med. Chem.* 40, 1565–1569 und 60 3687–3693, 1997). Allerdings wurden keine uPA-Hemmstoffe gefunden. So hemmt allerdings Melagatran, das C-terminal einen 4-Amidino-benzylamid-Rest besitzt, Trypsin ( $K_i = 4,0 \text{ nM}$ ) und Thrombin ( $K_i = 2,0 \text{ nM}$ ) sehr unspezifisch, während die Hemmung von uPA mit einem  $K_i = 6,3 \mu\text{M}$  drei Größenordnungen schwächer ist (D. Gustafsson et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7, 69–79, 1996; WO 94/29336).
- [0011]** Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, einen auch für therapeutische Anwendungen geeigneten Wirkstoff anzugeben, der Urokinase mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Synthesaufwand herstellbar ist.
- 65 **[0012]** Überraschend wurde gefunden, dass acyliertes Amidino-benzylamin gemäß der im Patentanspruch 1 angeführten allgemeinen Formel I, insbesondere Verbindungen des 4-Amidino-benzylamins, bei denen X, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> natürli-

# DE 100 29 014 A 1

che und/oder unnatürliche Aminosäuren ergeben, Urokinase sehr wirksam und selektiv hemmen. Einen besonders aktiven Urokinase-Hemmstoff bildet dabei Amidino-benzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren Gly und D-Ser gebunden sind und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe R<sub>4</sub> aus einem Aryl- bzw. Aralkyl-sulfonyl-Rest aufweist.

[0013] Neben Urokinase wurden andere Enzyme deutlich weniger gehemmt, so dass die erfindungsgemäßen Derivate des Amidino-benzylamins eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven uPA-Hemmstoffen darstellen. 5

[0014] Die Verbindungen liegen in der Regel als Salze mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, vor oder als Salze mit geeigneten organischen Säuren.

[0015] Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können, wie nachfolgend beschrieben, nach bekannten Verfahren auf relativ einfache Weise hergestellt werden: 10

Die Ausgangsverbindung 4-Cyanobenzylamin wird über Gabrielsynthese (G. Wagner und I. Wunderlich, Pharmazie 32, 76-77, 1977; B.C. Bookser und T.C. Bruice, J. Am. Chem. Soc. 113, 4208-4218, 1991) aus 4-Cyanobenzylbromid hergestellt. Aus dem so hergestellten 4-Cyanobenzylamin wird das Boc-geschützte Acetyloxamidino-benzylamin gewonnen. Die Ankopplung der weiteren Aminosäuren und der Schutzgruppe R<sub>4</sub> erfolgt mittels Standardkopplungsmethoden mit Boc als N-terminale Schutzgruppe. Die zweite Aminosäure kann auch direkt als N-aryl- bzw. N-aralkyl-sulfonyl-geschützte Aminosäure gekoppelt werden. Die Peptidanaloga werden sequentiell, beginnend vom Acetyloxamidino-benzylamin, aufgebaut. Die meisten Produkte kristallisierten gut und lassen sich damit einfach reinigen. Die Reinigung der Hemmstoffe erfolgt in der letzten Stufe über präparative, reversed-phase HPLC. 15

[0016] Die Erfindung soll nachstehend anhand von zwei Ausführungsbeispielen näher erläutert werden: 20

## Ausführungsbeispiel 1

### Synthese von Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidino-benzylamid × HCl

#### 1.1 Boc-4-Cyano-benzylamid 25

[0017] 20 g (0,151 mol) 4-Cyanobenzylamin wurden in 300 ml H<sub>2</sub>O, 150 ml Dioxan und 150 ml 1 N NaOH gelöst. Unter Eiskühlung wurden 37,5 ml Di-tert.-butyl-dicarbonat zugetropft und eine Stunde bei 0°C sowie weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan wurde im i. V. entfernt und der wässrige Rückstand 3-mal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden 3-mal mit 5%-iger KHSO<sub>4</sub>- und 3-mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i. V. eingeeengt (weiße Kristalle). HPLC: Acetonitril/H<sub>2</sub>O, Elution bei 44,1% Acetonitril. Ausbeute: 30,48 g (0,131 mol), 87%. 30

#### 1.2 Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid 35

[0018] Nach Judkins et al. (Synthetic Comm. 26, 4351-4367, 1996) wurden 30,48 g (0,131 mol) Boc-4-Cyano-benzylamid mit 13,65 g (0,197 mol) Hydroxylamin × HCl und 34 ml (0,197 mol) DIEA in 300 ml abs. Ethanol gelöst. Es wurde 2 Std. unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz i. V. eingeeengt, der Rückstand in ca. 200 ml Essigsäure gelöst und mit 18,67 ml (0,197 mol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 1 Std. wurde erneut eingeeengt, in Essigester gelöst und bei 0°C je 3-mal mit 5%iger KHSO<sub>4</sub>- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Einengen i. V. fiel ein weißes Pulver an. HPLC: Acetonitril/H<sub>2</sub>O, Elution bei 32,0% Acetonitril. Ausbeute: 31,3 g (0,102 mol) 78%. 40

#### 1.3 4-Acetyloxamidino-benzylamin × HCl 45

[0019] 5 mmol Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid werden in 20 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird i. V. weitgehend eingeeengt, das Produkt mit trockenem Diethylether gefällt, abgefrittet, nochmals mit frischem Ether gewaschen und i. V. getrocknet. Auf Grund der quantitativen Umsetzung wurde das Produkt ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt. 50

#### 1.4 Boc-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid

[0020] Die Kopplung von Boc-Gly-OH (Orpegen, Heidelberg) an 4-Acetyloxamidino-benzylamin erfolgte nach Frerot et al. (Tetrahedron 47, 259 ff., 1991). Dazu wurden 2,064 g (9,3 mmol) 4-Acetyloxamidino-benzylamin × HCl und 1,629 g (9,3 mmol) Boc-Gly-OH in ca. 25 ml DMF gelöst. Bei 0°C wurden dann 4,84 g (9,3 mmol) PyBOP und 3,878 ml (27,9 mmol) TEA zugegeben und der pH-Wert mit TEA auf 9 eingestellt. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i. V. eingeeengt, in Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer, basisch und neutral gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Ausbeute: 3 g (8,2 mmol) 88%. 60

#### 1.5 Boc-Gly-4-Amidino-benzylamid × AcOH

[0021] 3 g (8,2 mmol) Boc-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid wurden in 200 ml 90%iger Essigsäure gelöst. Anschließend wurden unter Argon 300 mg 10% Palladium auf Aktivkohle zugesetzt. Argon wurde durch eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt und der Ansatz unter kräftigem Rühren 24 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat i. V. eingeeengt. Ausbeute: 2,9 g (7,9 mmol) 96%. 65

# DE 100 29 014 A 1

## 1.6 H-Gly-4-Amidino-benzylamid x 2 HCl

**[0022]** 2,9 g (7,9 mmol) Boc-Gly-4-Amidino-benzylamid wurden in 100 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde i. V. weitgehend eingengt und mit trockenem Diethylether gefällt, danach abgefrittet und das Produkt nochmals mit frischem Ether gewaschen. Nach Trocknen des Produkts i. V. wurde es ohne weitere Aufreinigung für die Synthese nach Punkt 1.8 eingesetzt.

## 1.7 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH

**[0023]** 229 mg (1,173 mmol) H-D-Ser(Bz)-OH und 408 µl (2,345 mmol) DIEA wurden in 50 ml 50% Acetonitril gelöst. Dann wurden 335 mg (1,76 mmol) Benzylsulfonylchlorid zugegeben und 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde i. V. eingengt, mit Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer und neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde i. V. eingengt.  
Ausbeute: 289 mg (0,827 mmol) 71%.

## 1.8 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Gly-4-Amidino-benzylamid x TFA

**[0024]** 151 mg (0,433 mmol) Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH und 121 mg (0,433 mmol) H-Gly-4-Amidino-benzylamid x 2 HCl wurden in wenig abs. DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden 225 mg (0,433 mmol) PyBOP und 230 µl (1,32 mmol) DIEA zugegeben. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i. V. eingengt und das Produkt über HPLC gereinigt (Acetonitril/H<sub>2</sub>O, 0,1% Trifluoressigsäure, Elution bei 37,4% Acetonitril).  
Ausbeute: 232 mg (0,356 mmol) 82%.

## 1.9 Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidino-benzylamid x HCl

**[0025]** 50 mg HPLC-gereinigtes Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid werden in 50 ml 90%iger Essigsäure gelöst und mit 50 mg 10% Palladium auf Aktivkohle 48 Std. bei Raumtemperatur hydriert. Danach wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat i. V. eingengt. Das Produkt wird über HPLC gereinigt (Acetonitril/H<sub>2</sub>O, Elution bei 21,4% Acetonitril) und mittels Ionenaustauscher in die HCl-Form überführt.  
Ausbeute: 20 mg (0,036 mmol) 62%.

## Ausführungsbeispiel 2

### Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen mit Y = Amidino

R <sub>4</sub>	Konfiguration R <sub>3</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>	X-R <sub>1</sub>	Position Amidino	K <sub>i</sub> , µM
H	L	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH <sub>2</sub>	4	21
Boc	L	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH <sub>2</sub>	4	23
H	D	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH <sub>2</sub>	4	12
Ac	D	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH <sub>2</sub>	4	41
Bz-SO <sub>2</sub>	D	CH <sub>2</sub> -OH	H	CH <sub>2</sub>	4	0,036
Bz-SO <sub>2</sub>	D	CH <sub>2</sub> -O-Bz	H	CH <sub>2</sub>	4	0,84
H	D	CH <sub>2</sub> -O-Bz	H	CH <sub>2</sub>	3	> 1000
Boc	D	CH <sub>2</sub> -O-Bz	H	CH <sub>2</sub>	3	> 1000
Bz-SO <sub>2</sub>	D	CH <sub>2</sub> -O-Bz	H	CH <sub>2</sub>	3	> 1000

## Bestimmung der Hemmwirkung

**[0026]** Zur Bestimmung der Hemmwirkung wurden 200 µl Tris-Puffer (0,05 M, 0,154 M NaCl, 5% Ethanol, pH 8,0; enthält den Inhibitor), 25 µl Substrat (Bz-βAla-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O) und 50 µl sc-Urokinase bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (Dynatech MR 5000) bestimmt. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden nach Dixon (Biochem. J. 55, 170-171, 1953) durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K<sub>i</sub>-Werte sind das Mittel aus minde-

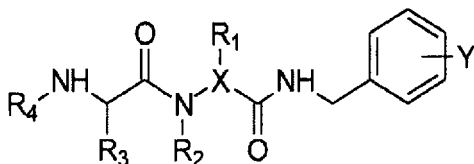
stens drei Bestimmungen.

## Verwendete Abkürzungen

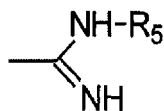
Ac	Acetyl	5
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl	
Bz	Benzyl	
DIEA	Diisopropylethylamin	
DMF	N,N-Dimethylformamid	
i. V.	im Vakuum	10
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat	
TEA	Triethylamin	
TFA	Trifluoressigsäure	
THF	Tetrahydrofuran	15

## Patentansprüche

1. Urokinase-Hemmstoffe der allgemeinen Formel I:



in denen der Substituent Y in 3- oder 4-Position vorkommen kann und eine Amidino-Gruppe



darstellt, in welcher R<sub>5</sub> ein H, ein OH oder einen Carbonylrest -CO-R bzw. Oxycarbonylrest -COO-R besitzt, wobei R ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1–16 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest oder ein substituierter oder unsubstituierter Aralkyl- oder Heteroaralkylrest sein kann, X eine CH-Gruppe oder N ist,

R<sub>1</sub> als H bzw. als ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1–8 C-Atomen oder als ein (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH mit n = 1–5 ausgebildet ist,

R<sub>2</sub> ein H oder ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1–8 C-Atomen ist,

R<sub>3</sub> als ein (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH mit n = 1–5 ausgebildet ist oder ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1–8 C-Atomen ist,

und R<sub>4</sub> einen Sulfonylrest -SO<sub>2</sub>-R, einen Carbonylrest -CO-R, einen Oxycarbonylrest -COO-R oder ein H darstellt, wobei

R ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1–16 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest, ein substituierter oder unsubstituierter Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl- oder ein Campherrest ist.

2. Urokinase-Hemmstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Amidinobenzylamid die Amidino-Gruppe in 4-Position steht und dass daran die Aminosäuren Gly und D-Ser sowie als R<sub>4</sub> ein Aryl- oder ein Aralkyl-sulfonyl-Rest gebunden sind.

3. Verwendung der Urokinase-Hemmstoffe gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von oral, subkutan, intravenös bzw. transdermal verabreichbaren Arzneimitteln für die Tumorbekämpfung.

4. Verwendung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Urokinase-Hemmstoffe als Arzneimittel in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder Pflaster etc. eingesetzt werden.

5. Verwendung der Urokinase-Hemmstoffe gemäß Anspruch 1 als diagnostisches Mittel, insbesondere bei der Tumorumtersuchung.

- Leerseite -